

## 上皮性 $\text{LK}^+$ チャンネルにおける $\text{Rb}^+$ イオン依存性 異常モル電流に関する研究

著者	大佐賀 敦
号	1931
発行年	2003
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22423">http://hdl.handle.net/10097/22423</a>

氏 名（本籍）	おお <sup>さ</sup> 大 佐 <sup>が</sup> 賀 <sup>あつし</sup> 敦
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 9 3 1 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学 位 論 文 題 目	上皮性 $LK^{+}$ チャネルにおける $Rb^{+}$ イオン依存性 異常モル電流に関する研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教授 丸 山 芳 夫	教授 根 東 義 明
	教授 永 富 良 一	

# 論文内容要旨

## 背景

上皮性 LK<sup>+</sup> チャネル (large-conductance K<sup>+</sup> channel) は高いイオンの選択性を保ちつつ大きなコンダクタンスを実現するという、一見相反する要件を満たしたイオンチャネルである。K<sup>+</sup> とその水和水とが狭い K<sup>+</sup> 選択性フィルタを一列で移動する「一列拡散」の機序の解明は、過去半世紀にわたるイオンチャネル研究における重要課題である。近年の K<sup>+</sup> チャネルの X 線結晶構造解析の結果は、イオン透過の基本である「多イオン一列拡散」に構造的根拠を与えた。この構造を基に、エネルギー最小化の観点から K<sup>+</sup> イオンの「協奏移動モデル」が提唱された。これは「フィルタ内の K<sup>+</sup> イオンは、イオン拡散に伴う自由エネルギーを最小とするような 2 つの状態配置を取り、K<sup>+</sup> イオンの移動は、この 2 状態間の遷移に伴って進行する」というものである。

従来より、K<sup>+</sup> チャネルにおいては、K<sup>+</sup> と Rb<sup>+</sup> の 2 イオン存在下での逆説的イオン伝導が知られている。これは「Rb<sup>+</sup> 電流そのものは小さく、従って Rb<sup>+</sup> の絶対的な透過性は小さいが、逆転電位が極めて 0 に近いことから、K<sup>+</sup> に対する相対的な透過性は高い (Rb<sup>+</sup> パラドックス)」と記述されており、Rb<sup>+</sup> がチャネルに対する「透過性」と「ブロック」という二重性を有することを示唆している。また一般に、多イオンチャネルに 2 つのイオン種が存在する場合、チャネル透過性の低いイオン種は、透過性の高いイオン種に比較してチャネルに対する結合親和性が強く、それゆえ、チャネル内により長時間滞在する、とされている。

## 目的

本研究では、協奏移動モデルをイオンチャネルの電気的現象を説明する枠組みとして用い、イオンとチャネルとの結合親和性の観点から、Rb<sup>+</sup> はいかなる様式で通常のイオン伝導に干渉し、その結果、チャネルは Rb<sup>+</sup> 存在下でどのような挙動を示すのかを明らかにすることを目的とした。

## 方法

ddy マウス (7 ~ 8 週齢) の顎下腺に酵素処理を施し得られた腺房細胞に対し、細胞内外の K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> 濃度を対称または非対称に変化させ、標準的なパッチクランプ法により、同細胞のインサイドアウトパッチ膜における LK<sup>+</sup> チャネルの単一チャネル電流振幅を計測し、電流-電圧関係曲線 (i/V 曲線) を解析した。その結果を用い、協奏移動モデルの枠組みに基づき、2 イオン存在下における i/V 曲線の定式化を試みた。

## 結 果

電流振幅は  $\text{Rb}^+$  のチャンネルへの進入を促進する電位レベル ( $\text{Rb}^+$  が細胞外(内)の場合, 負(正)の膜電位) において,  $\text{Rb}^+$  のモル分率依存性に減少した。一方,  $\text{K}^+$  のみがチャンネルに進入しやすくなる電位 ( $\text{Rb}^+$  が細胞外(内)の場合, 正(負)の膜電位) では, このようなコンダクタンスの減少は認められず, ほぼ一定のまま  $\text{K}^+$  コンダクタンスを保持した。逆転電位は  $\text{K}^+$  の Nernst 電位から 0mV 付近へと大きく移動し,  $i/V$  曲線は逆転電位付近で  $\text{Rb}^+$  モル分率依存性に鋭く屈曲した。このような  $i/V$  曲線に対し, 1) イオンとチャンネルとの結合親和性「結合親和性比  $A$ 」, 2)  $\text{Rb}^+$  がフィルタサイト間を移動する際のイオン衝突による段階的なエネルギー供与「衝突係数  $\chi$ 」, の概念を新たに導入することにより, 定電場仮説に基づくフラックス式を包括し, かつ  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  2 イオン存在下の異常電流を含む種々のイオン組成において有効な数理モデル式を導出した。この式に実験値を適用し, 各変数の様相を検討したところ, 細胞内外の一方のみに  $\text{Rb}^+$  が存在する条件では,  $\text{Rb}^+$  が細胞外から内へ移動する時 ( $A=6.0$ ) は, 内から外へ移動する時 ( $A=2.0$ ) に比較し,  $\text{Rb}^+$  の結合親和性が 3 倍大きい, 細胞内外共に  $\text{Rb}^+$  が存在する条件では, いずれの方向に  $\text{Rb}^+$  が移動しても  $A=6.0$  であった。また, 衝突係数  $\chi$  は  $\text{Rb}^+$  モル分率の上昇に伴い増加し, 一定値に収束した。

## 考 察

結合親和性比  $A$  の変化の様相から,  $\text{Rb}^+$  のチャンネルに対する結合親和性は一樣一定ではなく, フィルタ内のイオン通過経路に沿って非対称に分布し, かつ細胞内外のイオン組成—特に細胞外  $\text{Rb}^+$  の存在と  $\text{Rb}^+$  が移動する方向により動的に変化することが示唆された。この現象は  $\text{Ba}^{2+}$  が  $\text{K}^+$  チャンネルをブロックする際の "outer lock-in effect" に類似しているが, 今回の  $\text{Rb}^+$  の挙動は,  $\text{Rb}^+$  により  $\text{Rb}^+$  自身がフィルタ内にロックされるという "self lock-in" の様相を呈している。

そして,  $\text{Rb}^+$  依存性の異常電流は, 1)  $\text{K}^+$  と  $\text{Rb}^+$  とのチャンネルに対する結合親和性の違い, 2)  $\text{Rb}^+$  がフィルタサイト間を移動する際のイオン衝突による段階的なエネルギー供与, の 2 つが関与する複合的な機序によるものであることが示唆された。また,  $\text{Rb}^+$  パラドックスは異常モル分率効果の一種であり, 本質的に同一の機序によるものであると考えられた。

## 審査結果の要旨

イオンチャネルが持つ特性の1つにイオンの選択透過性がある。 $K^+$ チャネルにおいては $K^+$ 選択性フィルタがその役割を担っており、 $K^+$ イオンとその水和水とが狭い選択性フィルタを一系列で移動する「一列拡散」の機序の解明は、過去半世紀にわたるイオンチャネル研究における重要課題である。また、 $K^+$ 、 $Rb^{+2}$ イオン存在下では逆説的な異常電流が報告されているが、その機序の解明もいまだなされていない。

近年、X線結晶構造解析により $K^+$ チャネルの立体構造が明らかとなり、この構造を基にイオン拡散に伴うエネルギー最小化の観点から $K^+$ イオンの「協奏移動モデル」が提唱された。しかし、これは結晶構造というチャネルの静的状態とコンピュータ・シミュレーションを基に提唱されたものであり、実際に機能しているチャネルの動態を直接検討したものではないという限界が存在する。

本研究では協奏移動モデルをイオンチャネルの電気的現象を説明する枠組みとして用い、イオンとチャネルとの結合親和性の観点から、通常のイオン伝導に対する $Rb^+$ の干渉様式および $Rb^+$ 存在下におけるチャネルの挙動について検討した。

マウス顎下腺腺房細胞の $LK^+$ チャネルを対象に、 $K^+$ 、 $Rb^+$ イオン組成を系統的に変化させ、パッチクランプ法により単一チャネル電流を測定し、電流-電圧関係曲線( $i/V$ 曲線)を得た。電流振幅は $Rb^+$ のチャネルへの進入を促進する電位レベルにおいて、 $Rb^+$ のモル分率依存性に減少した。一方、 $K^+$ のみがチャネルに進入しやすくなる電位では、このようなコンダクタンスの減少は認められなかった。逆転電位は $K^+$ のNernst電位から0mV付近へと大きく移動し、 $i/V$ 曲線は逆転電位付近で $Rb^+$ モル分率依存性に鋭く屈曲した。

この $i/V$ 曲線に対し、イオンとチャネルとの結合親和性の違い「結合親和性比」、 $Rb^+$ がフィルタサイト間を移動する際のイオン衝突による段階的なエネルギー供与「衝突係数」、の2概念を新たに導入することにより、定電場仮説に基づくフラックス式を包括し、かつ $K^+$ 、 $Rb^{+2}$ イオン存在下の異常電流を含む種々のイオン組成において有効な数理モデル式を導出した。その結果、 $Rb^+$ のチャネルに対する結合親和性は一様一定ではなく、フィルタ内のイオン通過経路に沿って非対称に分布し、かつ細胞内外のイオン組成-特に細胞外 $Rb^+$ の存在と $Rb^+$ の移動方向により動的に変化することが示唆された。その機序として、 $Rb^+$ により $Rb^+$ 自身が選択性フィルタ内にロックされる self lock-in 機構を提唱した。

本論文は、X線結晶構造解析およびコンピュータ・シミュレーションから提唱されたモデルを枠組みとして用い、実験により観察されるイオンチャネルの電気的挙動を説明したものである。そして、 $Rb^+$ 依存性の異常電流の機序を新たに提唱している。以上より、本論文は学位に値すると判断された。